

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
31 juillet 2003 (31.07.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/062811 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 27/327, C12Q 1/00, 1/68

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris
Cedex 16 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/04283

(22) Date de dépôt international :
11 décembre 2002 (11.12.2002)

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BOCKEL-
MANN, Ulrich [DE/FR]; 33, rue des Cascades, F-75020
Paris (FR). POUTHAS, François [FR/FR]; 18, rue des Go-
belins, F-75013 Paris (FR).

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(74) Mandataire : CABINET ORES; 36, rue de St Peters-
bourg, F-75008 Paris (FR).

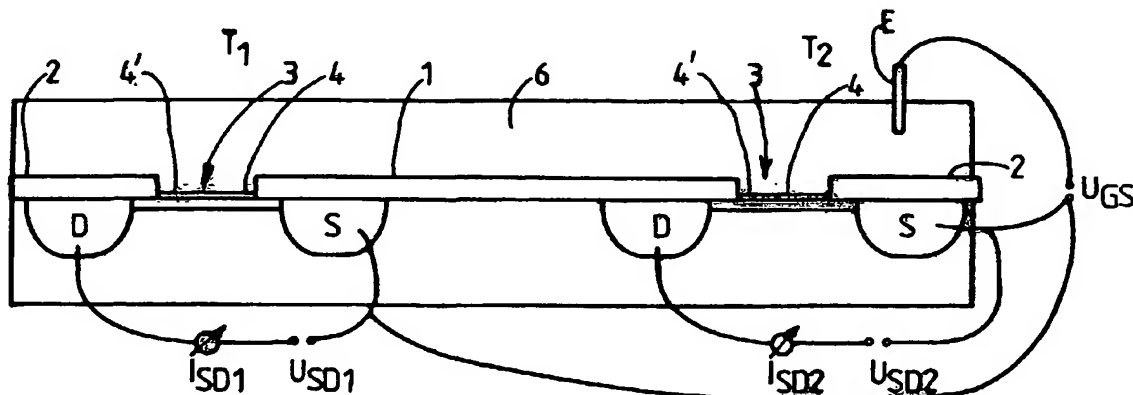
(30) Données relatives à la priorité :
02/00676 21 janvier 2002 (21.01.2002) FR

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: DETECTION OF MOLECULAR PROBES FIXED TO AN ACTIVE ZONE OF A SENSOR

(54) Titre : DETECTION DE MOLECULES SONDES FIXEES SUR UNE ZONE ACTIVE D'UN CAPTEUR.



(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting at least one parameter representative of molecular probes fixed to active zones (3) of a sensor, characterised in that said sensor comprises a network of field-effect transistors (T1, T2...) each of which has a source region (S), a drain region (D) and a gate region which form an active zone (3) on which said representative parameter may be detected, comprising the following steps: a) bringing some of said zones (3) into contact with molecular probes in order to fix the above, b) bathing at least those zones which have been brought into contact with a molecular probe in an electrolyte solution (6) and c) measurement of at least one point on the current curve for the drain voltage, the gate-source voltage and the source-drain for at least two transistors of a first group, corresponding to zones (3), brought into contact with a molecular probe in order to infer at least one said parameter by comparison of at least two of said measurements obtained for two different zones (3).

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé de détection d'au moins un paramètre représentatif de molécules sondes fixées sur des zones actives (3) d'un capteur. Il est caractérisé en ce que ledit capteur est constitué par un réseau de transistors à effet de champ (T1, T2...) dont chacun présente une région de source (S), une région de drain (D), ainsi qu'une région de porte qui constitue une dite zone active (3) sur laquelle ledit paramètre représentatif doit être détecté et en ce qu'il comporte les étapes suivantes : a) mettre en contact certaines desdites zones (3) avec des molécules sondes pour réaliser leur fixation, b) baigner dans une solution d'électrolyte (6) au moins ces

[Suite sur la page suivante]

BEST AVAILABLE COPY

501, 112

WO 03/062811 A1



DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

zones qui ont été mises en contact avec des molécules sondes,c) mesurer au moins un point de la caractéristique courant de drain/tension source-porte/tension source-drain d'au moins deux des transistors d'un premier groupe correspondant à des zones (3) mises en contact avec des molécules sondes pour en déduire au moins un dit paramètre représentatif par comparaison entre au moins deux dites mesures obtenues pour deux différentes zones (3).

DETECTION DE MOLECULES SONDES FIXEES SUR UNE ZONE ACTIVE D'UN CAPTEUR

5 La présente invention a pour objet un procédé de détection d'au moins un paramètre représentatif de molécules sondes fixées sur des zones d'un capteur.

On connaît déjà un procédé de détection de l'hybridation de séquences d'ADN à l'aide d'un transistor à effet de champ, tel qu'il a été décrit dans l'article de E. SOUTEYRAND et collaborateurs intitulé « Direct
10 Detection of the hybridization of synthetic Homo-Oligomer DNA Sequences by Field Effect » paru en 1997 dans le J. Phys. Chem. B1997, 101, pages 2980 à 2985. Un transistor de type ISFET (« Ion-Sensitive – Field Effect Transistor ») utilisable dans ce type d'application a été décrit dans l'article de
15 Piet BERGVELD « Development, Operation and Application of the ISFET as a Tool for Electrophysiology paru dans IEEE Transactions on Biomedical Engineering volume BME-19 – n° 5 Sept 1972 pages 342 à 351. Des indications sur la fabrication de telles structures de transistors peuvent être
20 trouvées dans l'article de V. KIESSLING et collaborateurs, intitulé « Extracellular Resistance in Cell Adhesion Measured with a Transistor Probe » paru dans Langmuir 2000 16, pages 3517 – 3521. Enfin un mode de préparation des surfaces a été décrite dans l'article de A. KUMAR et
collaborateurs, intitulé « Silanized nucleic acids : a general platform for DNA immobilization » paru dans Nucleic Acid Research 2000, volume 28, n° 14,
25 pages i à vi.

Deux procédés de fixation des molécules sondes sur la surface sont notamment utilisables dans le cadre de la présente invention. Le premier consiste en une synthèse directe sur solide, telle que décrite par
30 exemple dans l'article de S.P.A. Fodor et Collaborateurs intitulé « Light-directed, spatially adressable parallel chemical synthesis » paru dans Science 251, pages 767 à 773 (1991). Le deuxième est la fixation des molécules à partir d'une dilution.

Dans le cas des capteurs comportant une pluralité de zones actives, par exemple les puces à ADN, ou les puces à protéines, il n'existe
35 pas actuellement de technique disponible permettant de contrôler facilement

et de manière relativement rapide sur quelles zones des molécules sondes ont été fixées effectivement.

La présente invention a ainsi pour but un procédé de détection d'au moins un paramètre représentatif de molécules sondes fixées sur au moins une zone d'un capteur, notamment en vue de contrôler le dépôt et la fixation locales des molécules sondes, pour permettre en particulier de remédier au moins partiellement aux problèmes que posent les variations expérimentales importantes qui sont fréquemment rencontrées en pratique.

La présente invention concerne ainsi un procédé de détection d'au moins un paramètre représentatif de molécules sondes fixées sur au moins une zone active d'un capteur, caractérisé en ce que ledit capteur est constitué par un réseau de transistors à effet de champ dont chacun présente une région de source, une région de drain, et une région de porte qui constitue une dite zone active sur laquelle ledit paramètre représentatif des molécules sondes doit être détecté et en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

a) mettre en contact certaines desdites zones avec des molécules sondes pour réaliser leur fixation,

b) baigner dans une solution d'électrolyte au moins ces zones qui ont été mises en contact avec des molécules sondes,

c) mesurer au moins un point de la caractéristique courant de drain/tension source-porte / tension source-drain d'au moins deux des transistors d'un premier groupe correspondant à des zones mises en contact avec des molécules sondes, par exemple en appliquant à ces transistors du premier groupe dont le drain et la source ont été polarisés, une tension donnée par exemple constante entre la porte et la source ou bien un courant de drain donné par exemple constant, pour en déduire au moins un dit paramètre représentatif par comparaison entre au moins deux des mesures obtenues pour deux différentes zones. Ladite comparaison est préférentiellement réalisée à l'aide d'une mesure différentielle. Le paramètre représentatif peut être une détection de la fixation de molécules sondes.

Entre les étapes a et b, il peut être prévu un rinçage.

Selon un mode particulier de mise en œuvre, le procédé est caractérisé en ce qu'il comporte après a) et avant b) les étapes suivantes :

a1) rinçage

a2) ajout d'une solution contenant des molécules cibles susceptibles d'interagir spécifiquement avec les molécules sondes, par exemple de s'hybrider avec celles-ci dans le cas où les molécules sondes sont de l'ADN, éventuellement suivi d'un rinçage.

5 Selon un autre mode particulier de mise en œuvre, le procédé est caractérisé en ce qu'il comporte après c, les étapes suivantes :

d) ajout d'une solution d'électrolyte contenant des molécules cibles susceptible d'interagir spécifiquement avec les molécules sondes, par exemple de s'hybrider dans le cas où les molécules sondes sont de l'ADN.

10 e) mesurer au moins un point de la caractéristique courant de drain/tension source-porte / tension source-drain d'au moins deux des transistors d'un deuxième groupe correspondant à des zones mises en contact avec des molécules sondes et avec des molécules cibles, par exemple en appliquant une tension par exemple constante entre la porte et la
15 source de ces transistors du deuxième groupe dont le drain et la source ont été polarisés ou un courant donné par exemple constant à la source de ces transistors du deuxième groupe, pour obtenir par comparaison au moins un dit paramètre représentatif.

20 Le procédé peut mettre en œuvre une pluralité de dites mesures d'au moins un point de la caractéristique, qui sont espacées au cours du temps. Ceci permet une mesure doublement comparative, dans l'espace et dans le temps.

Selon une première variante, la comparaison, notamment par mesure différentielle, est réalisée entre au moins deux transistors
25 correspondant à des zones qui sont baignées par une solution d'électrolyte, après avoir été mises en contact avec des molécules sondes.

Selon une deuxième variante préférée, cette comparaison, notamment par mesure différentielle, est réalisée entre au moins un transistor correspondant à une zone qui est baignée par une dite solution d'électrolyte
30 après avoir été mise en contact avec des molécules sondes et au moins un transistor correspondant à une zone qui est baignée par ladite solution d'électrolyte sans avoir été préalablement mise en contact avec des molécules sondes.

35 Les molécules sondes sont par exemple des molécules d'ADN, d'ARN ou de protéines.

Le procédé selon l'invention est compatible avec une détection classique d'interaction moléculaire par fluorescence.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture de la description ci-après, en liaison avec les
5 dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 représente deux transistors à effet de champ d'une puce de détection comprenant une pluralité de tels transistors organisés suivant un réseau mono ou bidimensionnel de transistors ;

- la figure 2 représente en vue de dessus un détail d'une puce
10 de détection et l'agencement des zones actives correspondant chacune à un transistor à effet de champ ;

- la figure 3 illustre les connexions électriques de drain des transmissions du réseau mono ou bidimensionnel, la figure 4 représentant la résistance des différentes connexions électriques de drain, la courbe A
15 représentant les valeurs calculées et la courbe B les valeurs mesurées, l'écart entre les courbes étant dû pour l'essentiel à la résistance de canal qui est constante.

- la figure 5 représente un dispositif de dépose de la solution sur des zones actives sélectionnées ;

- la figure 6 illustre la détection de présence d'ADN silanisé et de poly-L-lysine avec U_{SG} et U_{SD} constants, par variation du courant de drain I_{SD} ; et

- la figure 7 illustre la détection de présence d'ADN silanisé et de poly-L-lysine avec I_{SD} et U_{SD} constants, par détection de la variation de la
25 tension U_{SG} ;

- les figures 8A à 8C représentent les résultats d'expériences réalisées dans différentes conditions expérimentales ;

- les figures 9A à 9D montrent une détection électronique d'ADN ;

- et les figures 10A et 10B illustrent la mise en œuvre de canaux microfluidiques.

Les figures 1 à 3 illustrent un capteur présentant un réseau de transistors à effet de champ sur un substrat en silicium. Un transistor T_1 ou T_2 représenté en coupe à la figure 1 est pourvu d'une région de source S et d'une région de drain D qui présentent chacune un contact électrique et qui
35 sont surmontées d'une couche isolante respectivement 1 et 2, par exemple

un oxyde thermique de SiO_2 . La région active 3 entre la source S et le drain D forme la région de porte G du transistor et présente une couche isolante 4 d'épaisseur réduite, par exemple une couche de SiO_2 thermique. Il est également possible de ne pas disposer d'oxyde sur cette région active. La surface active est alors délimitée par une portion 4' du substrat qui est mise à nu.

Des molécules sondes, par exemple des molécules d'ADN simple brin, sont fixées par un procédé connu sur au moins certaines des surfaces actives 4 ou 4'. Pour l'ADN, on utilise de préférence des transistors à effet de champ à canal n à appauvrissement (pour lesquels les porteurs de charge sont les électrons, plus mobiles d'où une augmentation de la sensibilité) avec une polarisation de porte négative (c'est-à-dire que l'électrolyte est polarisé négativement par rapport au semi-conducteur), l'ADN se chargeant négativement (pour un électrolyte de pH neutre).

L'application d'une tension source-drain U_{SD} entre la source S et le drain D (U_{SD1} pour T_1 , et U_{SD2} pour T_2) et d'une tension porte-source U_{GS} entre l'électrolyte 6 et la source S (par exemple par une électrode E unique Ag/AgCl) induit un gaz bidimensionnel de porteurs de charges à l'interface Si/ SiO_2 , ou à l'interface Si/électrolyte de chaque transistor. Il en résulte un courant de drain I_D qui, pour chaque transistor, dépend de façon sensible de la charge à l'interface SiO_2 /électrolyte ou Si/électrolyte. On appelle surface active cette interface qui fait face au canal entre la source S et le drain D.

Le courant I_D dépend de la fixation des molécules sondes, par exemple des molécules d'ADN sur la surface active 4 ou 4'.

Comme le montrent les figures 2 et 3, n structures de type transistor à effet de champ sont intégrées dans un substrat de silicium recouvert d'un isolant (SiO_2 ou autre) et pourvu de connexions appropriées (métallisation ou de préférence régions conductrices dopées) par les prises de contact électrique de source 10 et de drain ($D_1, \dots D_n$). A la différence d'une structure de transistor MOS standard, il n'y a pas d'électrode métallique de porte. Ceci correspond à la structure de type « ISFET » (« Ion Sensitive Field Effect Transistor »). On utilise de préférence un substrat de type SOI (silicium sur isolant) qui procure une sensibilité plus élevée.

Les différentes structures sont à faible distance latérale l'une de l'autre et leurs surfaces actives sont en contact avec la même solution de mesure. Une dimension latérale typique dans la micro-électronique actuelle

est inférieure au μm . Dans la technologie des puces à ADN telle que mise en œuvre dans la présente invention, la dimension latérale est de 5-10 μm pour une synthèse directe sur le solide et de 50-100 μm dans le cas d'une fixation des molécules à partir d'une dilution.

5 Dans la présente configuration de mesure parallèle, plusieurs plots avec différents types de molécules sondes immobilisées sont en contact avec la même solution de mesure et au moins une structure de transistor se situe en dessous de chaque plot. La mise en oeuvre de plusieurs transistors par plot est possible au vu des dimensions mentionnées ci-dessus et permet
10 une redondance dans la détection.

Une électrode E (Ag/AgCl, par exemple), est utilisée pour fixer le potentiel de la solution de mesure 6 (électrolyte) par rapport à la structure en silicium qu'elle recouvre et pour fixer le point de travail des capteurs (transistors). Le potentiel de l'électrolyte 6 peut dans certains cas
15 être égal à zéro. La solution de mesure 6 qui baigne les capteurs contient des ions à une concentration qui donne une conductivité suffisante et qui ne donne pas lieu à un écrantage trop important au niveau des surfaces actives. Son pH est de préférence neutre.

Le procédé de détection des reconnaissances moléculaires
20 est basé sur une approche par comparaison, notamment différentielle. La mesure est réalisée en utilisant plusieurs structures de transistor en parallèle. La mesure peut être différentielle par rapport aux différents types de molécules greffées et inclure éventuellement plusieurs transistors par type de molécule. Il est également possible de comparer des signaux avant/après la
25 réaction qui révèle la reconnaissance moléculaire (et/ou l'évolution pendant cette réaction).

Le procédé selon l'invention permet de contourner les difficultés associées à la sensibilité d'un capteur individuel au pH et à la force ionique et celles associées à une variabilité d'un transistor individuel à l'autre
30 (ceci inclut la structure de transistor et la qualité de la fixation des sondes).

Un procédé selon un mode de réalisation préféré met en œuvre les étapes suivantes :

a) traitements homogènes de toute la surface isolante pour préparer la fixation des molécules sondes ;

35 b) greffage local de différents types de molécules sondes sur au moins certaines des surfaces actives individuelles ;

c) rinçages homogènes ;

d) mesure électronique : ajouter l'électrolyte de mesure, plonger l'électrode et mesurer les transistors (par exemple un ou plusieurs points de la caractéristique I_D en fonction de U_{SD} et de U_{SG}), et comparer les résultats obtenus selon les transistors ;

e) rinçages homogènes ;

f) et éventuellement ajout de la solution de molécules cibles en présence d'électrolyte et réaction de reconnaissance ;

g) rinçages homogènes ;

h) mesure électronique, comme (d).

En cas de mise en œuvre des étapes f à h, il est possible d'omettre c et d, c'est-à-dire de ne faire qu'une mesure électronique.

Certains transistors qui n'ont pas été mis en présence de molécules sondes (ou bien un seul transistor) peuvent servir de témoins. On mesure leurs caractéristiques après ajout de l'électrolyte de mesure qui par exemple, baigne l'ensemble des transistors.

Le greffage des molécules sondes est réalisé par dépôt de micro-gouttelettes de diamètre environ $100\ \mu$ sur les surfaces actives des transistors à l'aide de micro-plumes métalliques qui sont disponibles commercialement.

Comme le montre la figure 3, le réseau de n transistors (par exemple $n = 96$ transistors) présente n connexions de drain $D_1, D_2 \dots D_n$ et 2 connexions (non représentées) équivalentes à la source commune. Les résistances série R_c associées à ces connexions ont des valeurs qui dépendent de l'index $1 \dots n$ du drain.

Les valeurs de ces résistances R_c , réalisées par exemple par dopage du silicium, ne sont pas négligeables.

A cet effet les résistances R_c de connexion de drain sont calculées à partir des longueurs et des sections géométriques des lignes dopées dont on connaît la résistivité. Le calcul est comparé à une mesure de la résistance en fonction de l'index du drain en appliquant une tension continue (par exemple $U_{SD} = 0,1V$ et $U_{SG} = 2V$). Ceci permet d'obtenir une courbe de compensation donnée à titre d'exemple à la figure 4.

Une installation telle que celle représentée à la figure 5 peut être utilisée pour la mise en œuvre du procédé : sur une table 10, est disposée une platine 12 incorporant un dispositif de commande à micro-

contrôleur pour une table 11 assurant un déplacement selon trois directions perpendiculaires X, Y, Z. Une puce 15 incorporant le réseau de n transistors est disposée sur un support 14. Une autre platine 20 comportant une table 21 assurant un déplacement selon les trois directions X, Y, et Z est mise en œuvre pour déplacer un bras 22 portant une micro-plume ou une pipette 23 pour assurer le dépôt des micro-gouttelettes sur au moins certains des n transistors. Un objectif 17 et/ou une caméra couplée à un écran 19 permettent d'observer le dépôt des micro-gouttelettes et de contrôler les opérations.

On effectue des mesures de courant de drain I_D avec par exemple $U_{SG} = 1V$ et $U_{SD} = 0,9V$ et un électrolyte de pH neutre déposé qui est constitué de KCl à une teneur de 0,1 millimole par litre. Les transistors (canal p à accumulation) ayant leurs sources interconnectées, la tension de source ou la tension de porte peut servir de référence de tension (par exemple la tension de masse).

Une mise en œuvre du procédé sera maintenant décrite en liaison avec la figure 6.

Avant ces mesures, on effectue un traitement global de la surface de la structure Si/SiO₂ par incubation 1-2 minutes dans de l'acide sulfochromique et rinçage sous un courant d'eau déionisée puis incubation 3 à 5 minutes dans une solution de NaOH (60 µl NaOH 16N, 420µl d'éthanol et 220 µl d'eau), et enfin rinçage sous un courant d'eau déionisée.

La différence entre deux mesures effectuées avant dépôt local mais avant et après un rinçage à l'eau est présentée en petits carrés à la figure 6. Les croix représentent la différence entre une mesure effectuée après dépôt local de deux solutions différentes et une mesure faite avant le dépôt (la mesure faite avant le rinçage à l'eau).

Avec une pointe commerciale 23 (Telechem SMP3B) montée sur le dispositif 22 présenté à la figure 5, on dépose une solution 1 sur les transistors 5-7 (avec un contact entre pointe et surface), les transistors 19-21 et les transistors 33-37 et une solution 2 sur les transistors 66-69, les transistors 76-79, et les transistors 87-89.

Solution 1 : 0,5 µl oligonucléotide 20 mer modifiée thiol en 5' à 1 nmol/µl, 9 µl sodium acétate 30 mM à pH 4,3, 0,5 µl mercaptosilane 5mM dans sodium acétate, que l'on laisse réagir une heure à température ambiante, avant le dépôt.

Solution 2 : Poly-L-lysine (0,01% poids/volume « w/v » final (P8920, Sigma)) dans un tampon PBS 0,1X à pH 7.

Après les dépôts locaux, l'échantillon est séché 15 minutes en atmosphère humide et ensuite 5 minutes à 50°C.

5 La poly-L-lysine est positive dans l'électrolyte de mesure (pH neutre) à cause des groupements amines ionisés. La diminution du courant observé sur les dépôts de poly-L-lysine est compatible avec l'adsorption d'une charge positive sur la surface.

10 Pour la solution 1, la modification silane sur l'ADN réagit avec les groupements OH de SiO₂ et l'ADN est chargé négativement en solution.

Les solutions 1 et 2 donnent donc des signaux de signes opposés.

Une autre mise en œuvre de procédé sera maintenant décrite en liaison avec la figure 7.

15 On mesure la différence de potentiel de surface ΔU_{SG} correspondant à la mesure avant/après dépôt. Pour déterminer ΔU_{SG} , on mesure la caractéristique bidimensionnelle par exemple $I_D(U_{SG}, U_{SD})$ et on détermine les caractéristiques intrinsèques des 96 transistors en corrigeant numériquement en fonction des résistances R_c des lignes de drain en série.

20 La modification de l'état de l'interface SiO₂ induit un changement de la caractéristique intrinsèque qui correspond à un décalage ΔU_{SG} à U_{SD} et courant de drain I_D constants. Ce décalage permet d'obtenir directement une mesure indépendante du point de travail du transistor, contrairement au changement de courant ΔI_D présenté dans la figure 6. La valeur ΔU_{SG} permet

25 en première approximation de quantifier le changement de l'interface SiO₂/liquide induit par le dépôt local. Selon une variante, on fait varier U_{SG} de façon à garder I_D constant.

Les figures 8A à 8C montrent des mesures différentielles réalisées avant et après dépôt de poly-L-lysine (figure 8A), réalisées en

30 fonction de la concentration en KCl (figure 8B), et réalisées en fonction de la concentration en poly-L-lysine déposée.

A la figure 8A, les variations ΔI_D du courant de drain I_D sont représentées en ordonnée pour chacun des transistors 60 à 96 identifiés en

35 abscisse ($U_{SG} = 1$ V, $U_{SD} = 0,9$ V et électrolyte KCl à 0,1 mM). Les différences ΔI_D entre deux mesures réalisées avant un dépôt local mais séparées par un rinçage à l'eau sont représentées par des cercles. Les différences ΔI_D

correspondant à des mesures effectuées avant et après un dépôt local de poly-L-lysine sont représentées par des étoiles. Après le dépôt local on laisse l'échantillon 15 minutes à température ambiante en milieu humide, avant de le sécher à 50°C pendant 5 minutes. La dilution C_0 de la poly-L-lysine est de 0,01 % poids/volume "W/V" final (P8920, Sigma) dans un tampon PBS 0,1x à pH 7.

A la figure 8B, les différences ΔU_{SG} de la tension de source-grille U_{SG} sont mesurées sur une partie des transistors d'un réseau de 62 transistors FET avec $U_{SD} = 1,2$ V et $I_D = 50$ μ A. Les différences entre une mesure de référence (effectuée avant dépôt local et avec une concentration en KCl de 0,01 mM) et de deux séries de mesures (effectués après dépôt local de poly-L-lysine et avec différentes concentrations en KCl) sont représentées par des cercles et des étoiles. Ici, un dépôt local de poly-L-lysine a été effectué dans deux zones distinctes avec la même dilution C_0 que dans le cas de la figure 8A. Lors de chacune des deux séries de mesure, on fait varier la concentration de KCl dans le tampon de mesure entre 0,01 mM et 100 mM, en passant par les valeurs 0,1 mM, 1 mM et 10 mM. Entre les deux séries de mesure, on rince la surface à l'eau. On constate une sensibilité appréciable de la détection de la poly-L-lysine pour des concentrations de KCl entre 0,01 mM et 1 mM, et la hauteur des pics diminue progressivement au-delà de ces valeurs.

La figure 8C montre les variations ΔU_{SG} de la tension U_{SG} en fonction de la concentration en polymère déposé (poly-L-lysine), à savoir $2C_0$, C_0 , $C_0/2$, $C_0/4$, $C_0/8$ dans un tampon 0,1 x PBS pH 7, C_0 ayant la valeur indiquée pour les mesures de la figure 8A. Les conditions de mesure sont les suivantes : $U_{SD} = 1$ V, $I_D = 100$ μ A, et une concentration de 0,01 mM pour KCl. Ces mesures montrent qu'il n'y a pas avantage dans les conditions expérimentales choisies d'augmenter la concentration au-delà de C_0 .

Les figures 9A à 9D montrent la détection électronique d'ADN. Les tensions U_{SG} et les variations ΔU_{SG} de la tension U_{SG} correspondent à un point de fonctionnement $U_{SD} = 1$ V, $I_D = 100$ μ A, et à une concentration 0,01 mM en KCl. Elles sont obtenues à partir de la caractéristique $I_D(U_{SG}, U_{SD})$ et sont reportées sur les courbes avec en abscisse le numéro des transistors FET (1 à 96).

Les étoiles représentent la mesure avant traitement de surface initial à la soude tel qu'indiqué ci-dessus en liaison avec la figure 6. Les

cercles représentent la mesure après incubation de poly-L-lysine sur tout le réseau. Pour permettre une immobilisation de l'ADN, on incube le réseau de transistors FET pendant 30 minutes dans une dilution de poly-L-lysine (concentration C_0). Ensuite, sans effectuer de séchage préalable, on rince à l'eau et on sèche ensuite à l'air. L'incubation conduit à des décalages de la tension U_{SG} d'une valeur de 97 ± 50 mV (statistique sur 67 surfaces préparées) qui réduisent les variations entre transistors dans le signal électronique. Ces décalages sont compatibles à celles observées avec les valeurs mesurées en relation avec la figure 8C sur des dépôts locaux à la même concentration. Les carrés représentent les mesures après dépôt local d'oligonucléotides (5' Cy-5 modifiés 20 mer, concentration 50 μ M dans de l'eau désionisée) autour des transistors n° 30, 60 et 90. En niveau de gris et au dessus de la figure 9A, est représentée l'image en microfluorescence des trois points d'ADN précités.

La figure 9B montre la détection électronique et par fluorescence d'oligonucléotides Cy5 modifiés. Les points représentés par des étoiles ont été obtenus par différence ΔU_{SG} entre deux mesures électroniques réalisées avant et après 4 dépôts locaux avec des concentrations différentes en ADN (Ref. = 0 μ M, 5 μ M 10 μ M, 20 μ M). Ils montrent la variation ΔU_{SG} de la tension U_{SG} qui est observée dans les caractéristiques des transistors et qui est due aux dépôts locaux d'ADN. Les carrés montrent l'intensité de la fluorescence mesurée sur les transistors FET séchés, une fois la mesure électronique réalisée avec l'électrolyte. On notera que la même détection électronique est obtenue avec des oligonucléotides du même type, mais non modifiés.

La figure 9C montre la détection d'ADN double-brin après dépôt macroscopique de deux produits sur deux zones A et B des transistors FET. Avec une micropipette, on dépose 0,15 μ l prélevés dans deux tubes A et B sur deux régions respectives du réseau de transistors à effet de champ FET. Le réseau a été préalablement recouvert de poly-L-lysine pour immobiliser l'ADN et mesuré pour servir de référence. La zone A (transistors 1 à 20) de la figure 9C a été recouverte de la solution du tube A et la zone B (transistors 50 à 90) de la solution du tube B en laissant subsister entre elles une région centrale (transistors 21 à 49) non recouverte. On incube pendant 15 minutes sans sécher, puis on rince à l'eau et on mesure ensuite les transistors du réseau. Les transistors 1 à 20 (zone A) ont été incubés avec

une solution contenant des produits d'une réaction par polymérisation en chaîne (PCR) obtenus dans le tube A selon la procédure décrite ci-après. On constate dans cette zone un décalage vers le bas par rapport à la zone B (transistors 50 à 90) et par rapport à ladite zone non incubée entre A et B. En effet, la solution de référence mise en œuvre dans la zone B a été choisie pour ne pas produire de l'ADN double brin (tube B selon la procédure décrite ci-après).

A la figure 9D, dans la région MUT (transistors 1 à 35) sur laquelle a été déposée une solution obtenue par amplification PCR dans des conditions décrites ci-après, à partir d'ADN portant une mutation, on observe un décalage vers le bas de ΔU_{SG} , alors que dans la région de référence WT, pour laquelle l'ADN de départ ne portant pas la mutation, on n'observe pas un tel décalage.

Pour l'expérience de la figure 9C, la technique d'amplification PCR d'un fragment d'ADN à 1009 paires de bases met en œuvre l'ADN du bactériophage λ digéré par l'enzyme BstEII en utilisant deux amorces :

5' – CCG CGA ACT GAC TCT CCG CC

et 5' –CAG GCG GCA GGG CTG ACG TT .

Le protocole PCR est conduit sur un thermocycleur du commerce :

- initiation pendant 3 minutes à 94 °C
- 30 cycles de dénaturation / hybridation / extension de 30 secondes à 94°C/30 secondes à 57°C / et 2 minutes à 72°C.

Une étape finale de PCR est conduite pendant 3 minutes à 72°C.

Pour un volume de 50 microlitres, on utilise 10 nanogrammes de l'ADN λ digéré par Bst EII, 20 picomoles pour chacune des amorces, et les quatre dNTP ont une concentration finale de 50 μ M chaque. On met 0,5 microlitres de polymérase TAQ (à 1U/ μ l) de Roche Diagnostics dans le tampon standard de réaction PCR (fourni avec la polymérase TAQ). Ceci correspond à la préparation du tube A pour la zone A. Dans le tube de référence B (qui correspond à la zone B), on remplace un des quatre dNTP, à savoir le dTTP par du dCTP, de manière à conserver la même concentration totale en dNTP, ce qui inhibe la synthèse du produit d'ADN double brin.

Les produits de la PCR sont, dans l'un et l'autre cas, purifiés deux fois sur des colonnes "QIAQUICK" de la Société QIAGEN et éluées avec un tampon de Tris-Cl de pH 8,5 à une concentration de 10 mM.

L'amplification PCR spécifique de la mutation mise en œuvre dans le cadre de l'expérience correspondant à la figure 9D part d'un fragment du gène humain CX-26 (code d'accès M 86849, chromosome 13q11-12). Ce gène est amplifié à partir d'ADN génomique provenant d'un ou plusieurs patients. La technique de PCR met en œuvre des conditions et des amorces de cyclage décrites dans les articles de F. DENOYELLE et collaborateurs utilisés pour le premier "Prelingual Deafness : high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene" paru dans Human Molecular Genetics, 1997, vol. 6, n° 12, p. 2173 à 2177 et pour le deuxième "Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect : implications for genetic counselling" paru dans THE LANCET, vol. 353, 17 Avril 1999, p. 1298 à 1303. On utilise une polymérase Pwo (de Roche Diagnostics) dans un tampon PCR avec MgSO_4 à 1,5 mM. Les amorces sont le GAP1F et CONNR (voir le deuxième article précité de F. DENOYELLE, p. 1299 colonne de droite avant dernier paragraphe) et les conditions expérimentales sont celles du premier article précité du même auteur (p. 2177). On utilise une concentration finale de 0,6 μM pour chacune des amorces et de 0,2 mM pour chacun des dNTP.

Les produits de la PCR sont purifiés sur des colonnes "QIAQUICK" de la Société QIAGEN, et après une dilution (de 10 000 fois) servent d'ADN de départ dans la réaction spécifique de la mutation qui a lieu ensuite.

L'amplification PCR est choisie pour permettre la détection de la mutation 35delG (ou 30delG) dans le gène CX26, grâce à des amorces spécifiques de cette mutation. Les conditions de cycle et les séquences des amorces sont données dans l'article de G. LUCOTTE et collaborateurs intitulé "PCR test for diagnosis of the common GJB2 (connexin 26) 35delG mutation on dried blood spots and determination of the carrier frequency in France" publié dans Molecular and Cellular Probes (2001) 15, p. 57 à 59. On utilise 20 picomoles de chacun des oligonucléotides amorce pour un volume final de 50 μl .

Les deux amorces spécifiques de la mutation (voir article de LUCOTTE précité, page 58, colonne de droite M primer et N primer) et une

amorce commune (C primer) sont utilisées pour synthétiser les produits de PCR de 197 paires de bases. On réalise deux réactions PCR spécifiques sur chaque échantillon d'ADN, la première de ces réactions est réalisée avec la première amorce spécifique et donne un produit si la mutation est présente dans l'ADN de départ. La deuxième réaction est réalisée avec la deuxième amorce spécifique et donne un produit si la mutation n'est pas présente dans l'ADN de départ. Ceci permet de déterminer si un échantillon est normal, hétérozygote ou homozygote vis-à-vis de cette mutation.

Pour un volume de 50 μ l de milieu réactif, dans un tampon PCR standard, on utilise un microlitre d'ADN provenant de la préamplification décrite ci-dessus, 30 picomoles de chacune des amorces, des dTNP à une teneur 100 μ M et 1 microlitre de polymérase TAQ (1U/ μ l) de Roche Diagnosis. Les produits de PCR sont purifiés deux fois sur des colonnes "QIAQUICK" de la Société QIAGEN, et éluées avec un tampon Tris-Cl à 10 mM de pH 8,5. Pour les tube WT et MUT, on a utilisé la même paire d'amorces : C-primer et M-primer. La seule différence est l'ADN de départ.

Les figures 10A et 10B montrent un circuit intégré présentant des transistors T arrangés selon une ligne (ou plusieurs lignes). Deux canaux microfluidiques (par exemple parallèles) C_1 et C_2 d'un substrat 30 permettent de mettre un ou plusieurs transistors T à effet de champ en contact avec la solution qui circule dans un canal C_1 et/ou C_2 . Le matériau d'un substrat 30 qui comporte les canaux microfluidiques (ou capillaires) peut être un polymère PDMS (polydiméthylsiloxane) ou autre, un verre, du silicium, etc...

Il est ainsi possible de réaliser des mesures différentielles à partir de deux solutions qui circulent dans les deux canaux C_1 et C_2 . Il est également possible de réaliser sur un même substrat 30 un grand nombre de tels micro-canaux fluidiques, le substrat dans lequel ils sont ménagés étant solidarisé au substrat semi-conducteur dans lequel sont intégrés les transistors à effet de champ FET. Il est également possible de mesurer une variation à l'intérieur d'un canal donné. Cette variation peut être au cours du temps. Il est également possible d'injecter différentes solutions à un endroit donné dans un capillaire et le profil des concentrations reste inchangé le long du canal, même loin du point d'injection. On se reportera à l'article de Paul J. A. KENIS et al., intitulé "Microfabrication inside Capillaries Using Multiphase Laminar Flow Patterning" paru dans SCIENCE, vol. 285, 2 Juillet 1999, p. 83-85 (notamment figure 1A).

Une technique d'analyse mettant en œuvre la microfluidique est décrite dans l'article "Monolithic integrated microfluidic DNA amplification and capillary electrophoresis analysis system" de Eric T. LAGALLY et collaborateurs paru dans Sensors and Actuators B 63 (2000) p. 138-146.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de détection d'au moins un paramètre représentatif de molécules sondes fixées sur des zones actives d'un capteur, caractérisé en ce que ledit capteur est constitué par un réseau de transistors à effet de champ (T_1 , T_2 ...) dont chacun présente une région de source (S), une région de drain (D), ainsi qu'une région de porte qui constitue une dite zone active (3) sur laquelle ledit paramètre représentatif doit être détecté et en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

a) mettre en contact certaines desdites zones (3) avec des molécules sondes pour réaliser leur fixation,

b) baigner dans une solution d'électrolyte (6) au moins ces zones qui ont été mises en contact avec des molécules sondes,

c) mesurer au moins un point de la caractéristique courant de drain/tension source-porte/tension source-drain d'au moins deux des transistors d'un premier groupe correspondant à des zones (3) mises en contact avec des molécules sondes pour en déduire au moins un dit paramètre représentatif par comparaison entre au moins deux dites mesures obtenues pour deux différentes zones.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite mesure d'au moins un point de la caractéristique met en œuvre l'application d'une tension donnée (U_{DS}) entre le drain et la source d'au moins lesdits deux transistors du premier groupe ainsi que l'application dans un premier cas d'une tension donnée (U_{GS}) entre la porte et la source de ces transistors du premier groupe ou, dans un deuxième cas d'un courant de drain (I_D) donné à ces transistors du premier groupe,

3. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il présente entre a et b une étape de rinçage.

4. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte après a) et avant b) les étapes suivantes :

a1) rinçage

a2) ajout d'une solution contenant des molécules cibles susceptibles d'interagir spécifiquement avec les molécules sondes.

5. Procédé selon une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comporte après c, les étapes suivantes :

d) ajout d'une solution d'électrolyte (6) contenant des molécules cibles susceptibles d'interagir spécifiquement avec les molécules sondes.

5 e) mesurer au moins un point de la caractéristique courant de drain/tension, source-porte / tension source-drain d'au moins deux des transistors d'un deuxième groupe correspondant à des zones (3) mises en contact avec des molécules sondes et avec des molécules cibles pour obtenir par comparaison au moins un dit paramètre représentatif.

10 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que, au point e, la mesure d'au moins un point de la caractéristique met en œuvre l'application d'une tension donnée (U_{DS}) entre le drain et la source des transistors d'au moins lesdits deux transistors du deuxième groupe, et l'application dans un premier cas d'une tension donnée (U_{GS}) entre la porte et la source de ces transistors du deuxième groupe ou dans un deuxième cas
15 d'un courant de drain (I_D) donné à ces transistors du deuxième groupe,

7. Procédé selon une des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce qu'il met en œuvre une pluralité de dites mesures d'au moins un point de la caractéristique, qui sont espacées au cours du temps.

20 8. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite comparaison est réalisée par mesure différentielle.

9. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la comparaison est réalisée entre des mesures effectuées sur au moins deux transistors correspondant à des zones (3) qui
25 sont baignées par une solution d'électrolyte (6) après avoir été mises en contact avec des molécules sondes.

10. Procédé selon une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la comparaison est réalisée entre des mesures effectuées sur au moins un transistor correspondant à une zone (3) qui est baignée par une
30 solution d'électrolyte (6) après avoir été mise en contact avec des molécules sondes en vue de leur fixation et sur au moins un transistor correspondant à une zone qui est baignée par ladite solution d'électrolyte (6) sans avoir été mise en contact avec des molécules sondes.

35 11. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit paramètre représentatif est une détection de la fixation de molécules sondes sur une dite zone (3).

12. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les molécules sondes sont des molécules d'ADN, d'ARN ou de protéines.

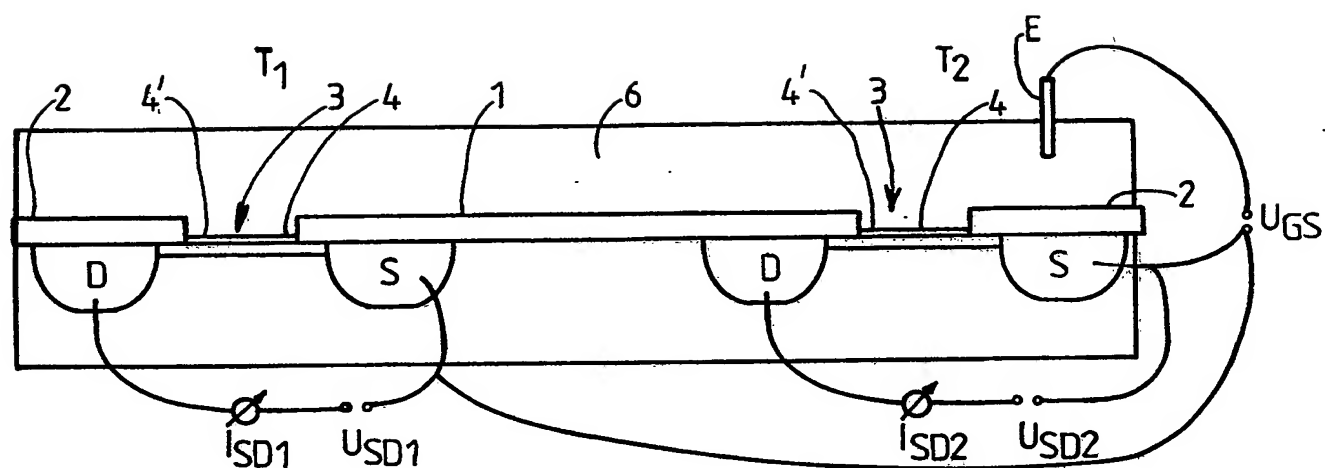
5 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que les molécules sondes sont des molécules d'ADN et en ce que les transistors à effet de champ sont de type à canal n à appauvrissement, avec une polarisation de porte négative.

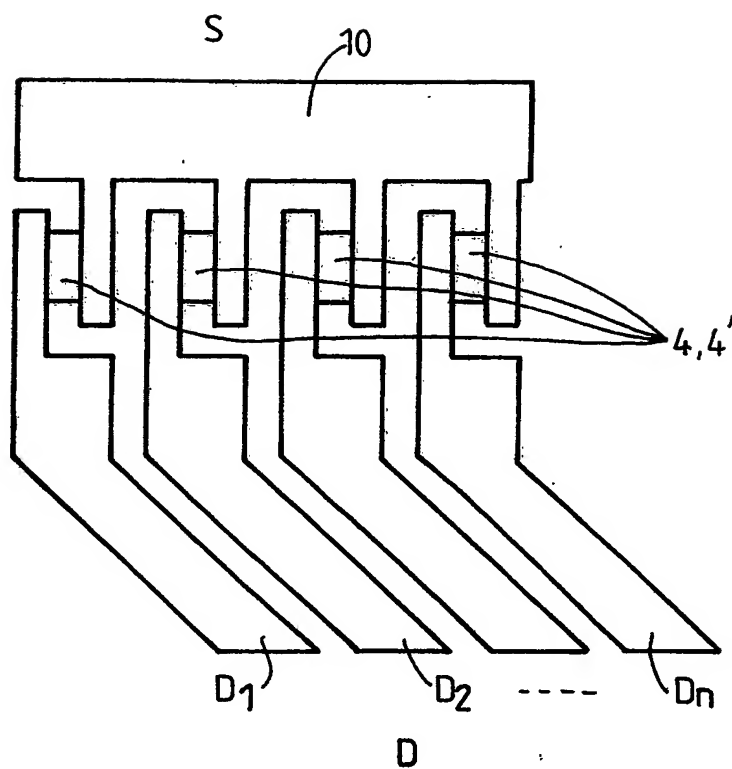
10 14. Procédé selon une des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce qu'il met en œuvre une détection par comparaison entre deux zones comprenant chacune au moins un dit transistor à effet de champ, la première zone étant baignée par une solution obtenue à partir d'une réaction enzymologique (par exemple amplification PCR) donnant un produit détectable spécifique de la présence ou de l'absence d'une mutation dans un premier échantillon d'ADN et la deuxième zone étant baignée par une solution
15 obtenue à partir d'une réaction enzymologique (par exemple amplification PCR) donnant un produit d'ADN spécifique de la présence ou de l'absence d'une mutation dans un deuxième échantillon d'ADN.

20 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le premier et le deuxième échantillons d'ADN proviennent de deux patients et en ce que la réaction enzymologique est la même pour les deux échantillons.

25 16. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le premier et le deuxième échantillons d'ADN sont identiques et proviennent du même patient et en ce que la réaction enzymologique dans la première zone est réalisée dans des conditions expérimentales produisant un produit d'ADN en l'absence de mutation dans le premier échantillon et en ce que la réaction enzymologique dans la deuxième zone est réalisée dans des conditions expérimentales produisant un produit d'ADN en présence d'une mutation dans le deuxième échantillon.

30 17. Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte la circulation à travers au moins un microcanal fluide d'une solution pour la mettre en contact avec au moins un dit transistor à effet de champ (T_1 , T_2 , ...).

FIG.1

FIG. 2

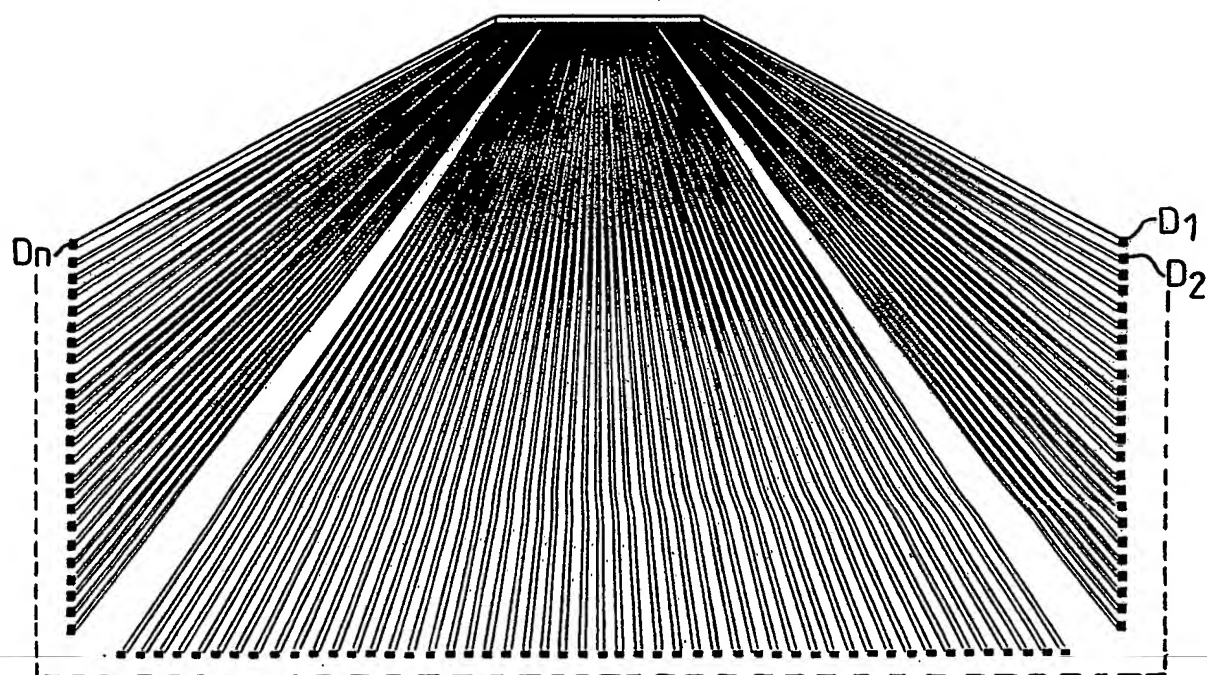


FIG. 3

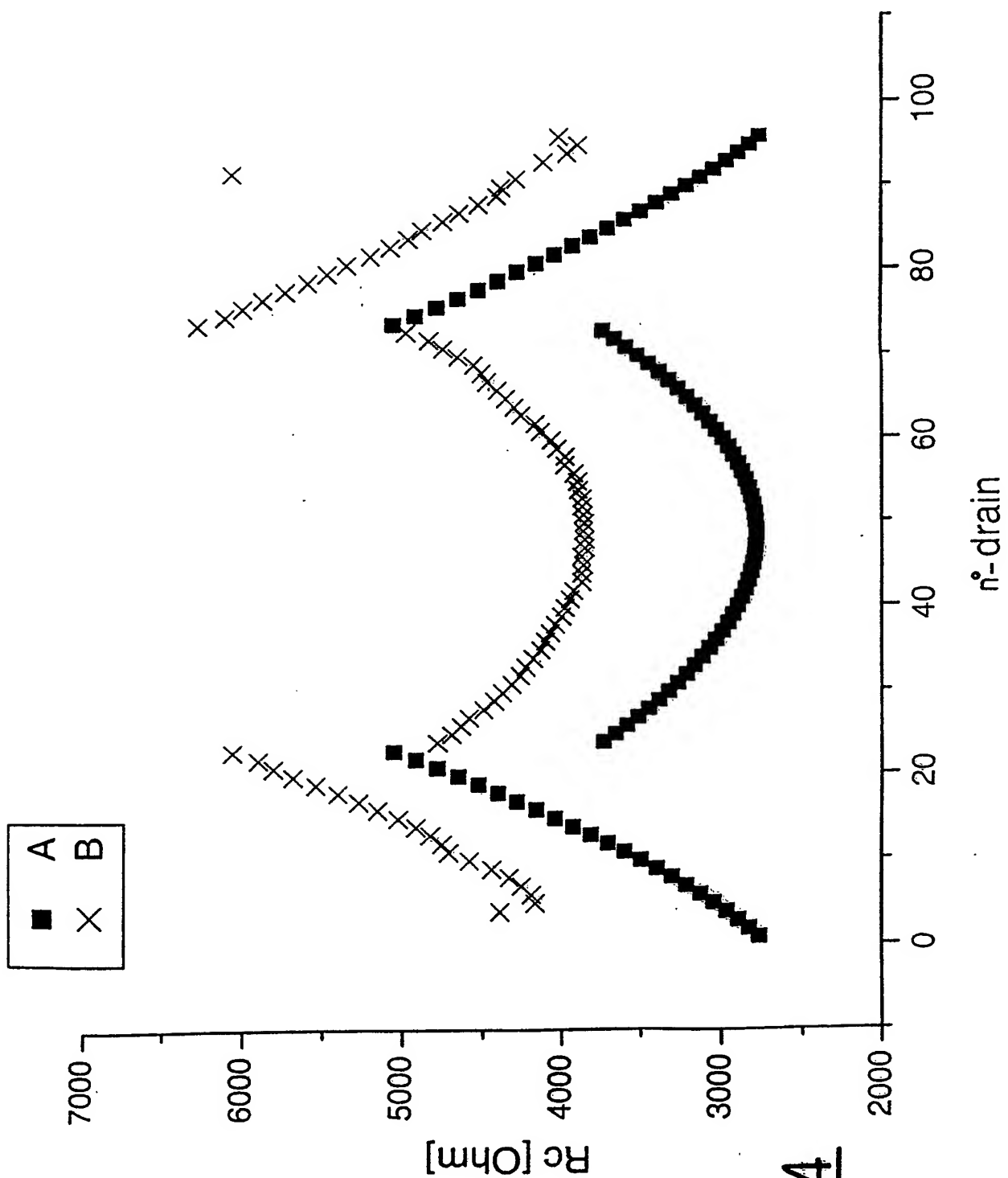
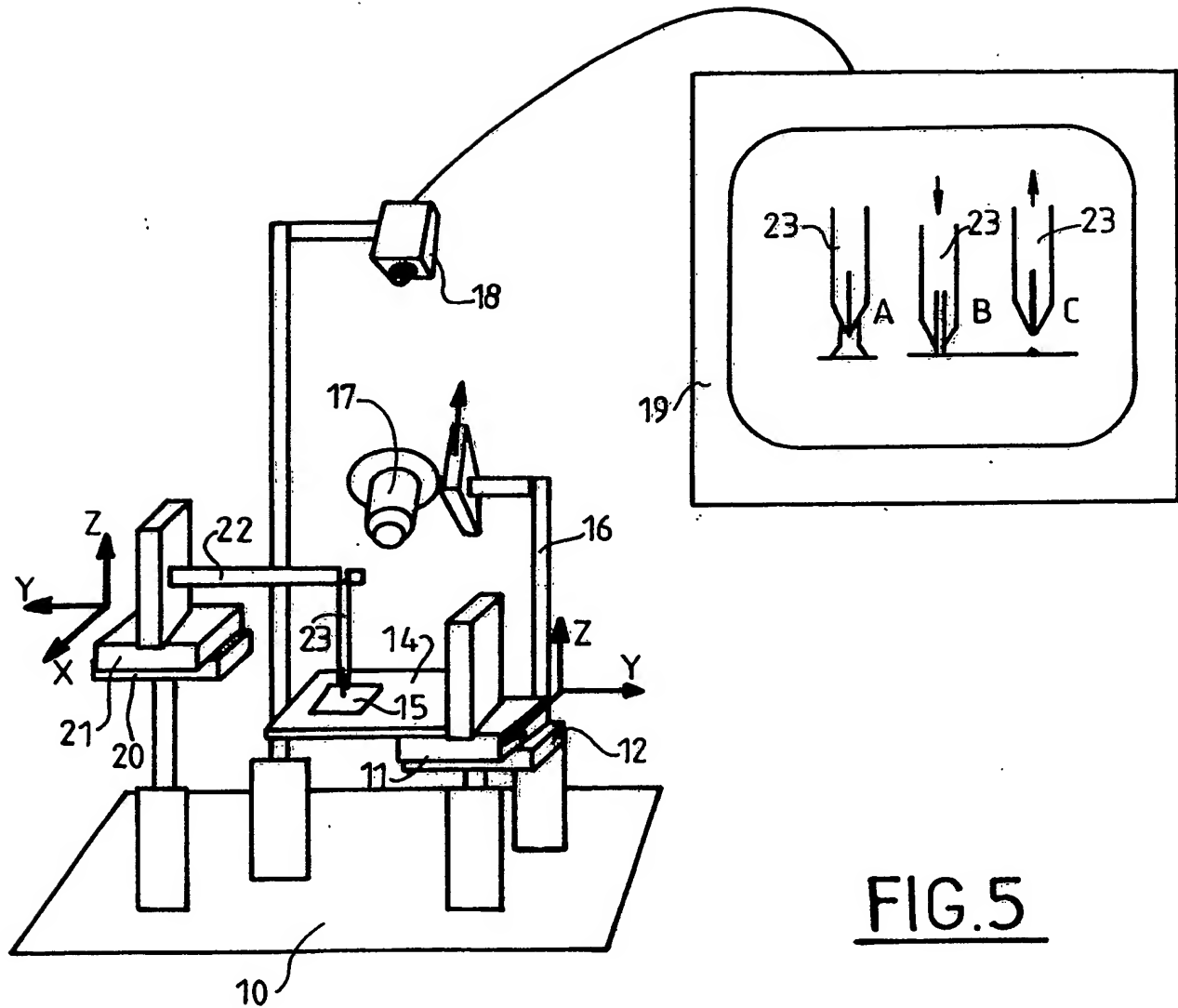


FIG.4

5/12

FIG. 5

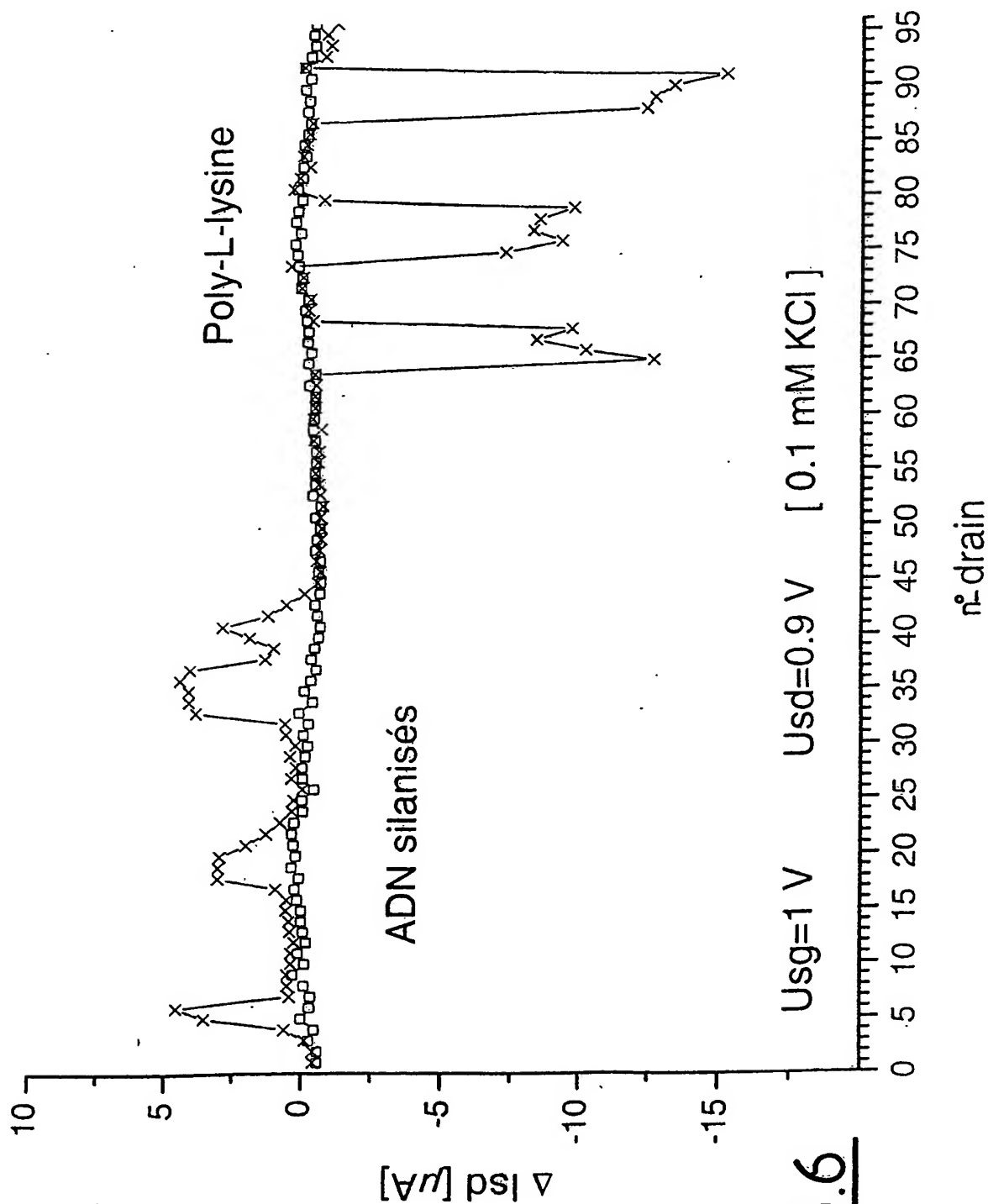


FIG.6

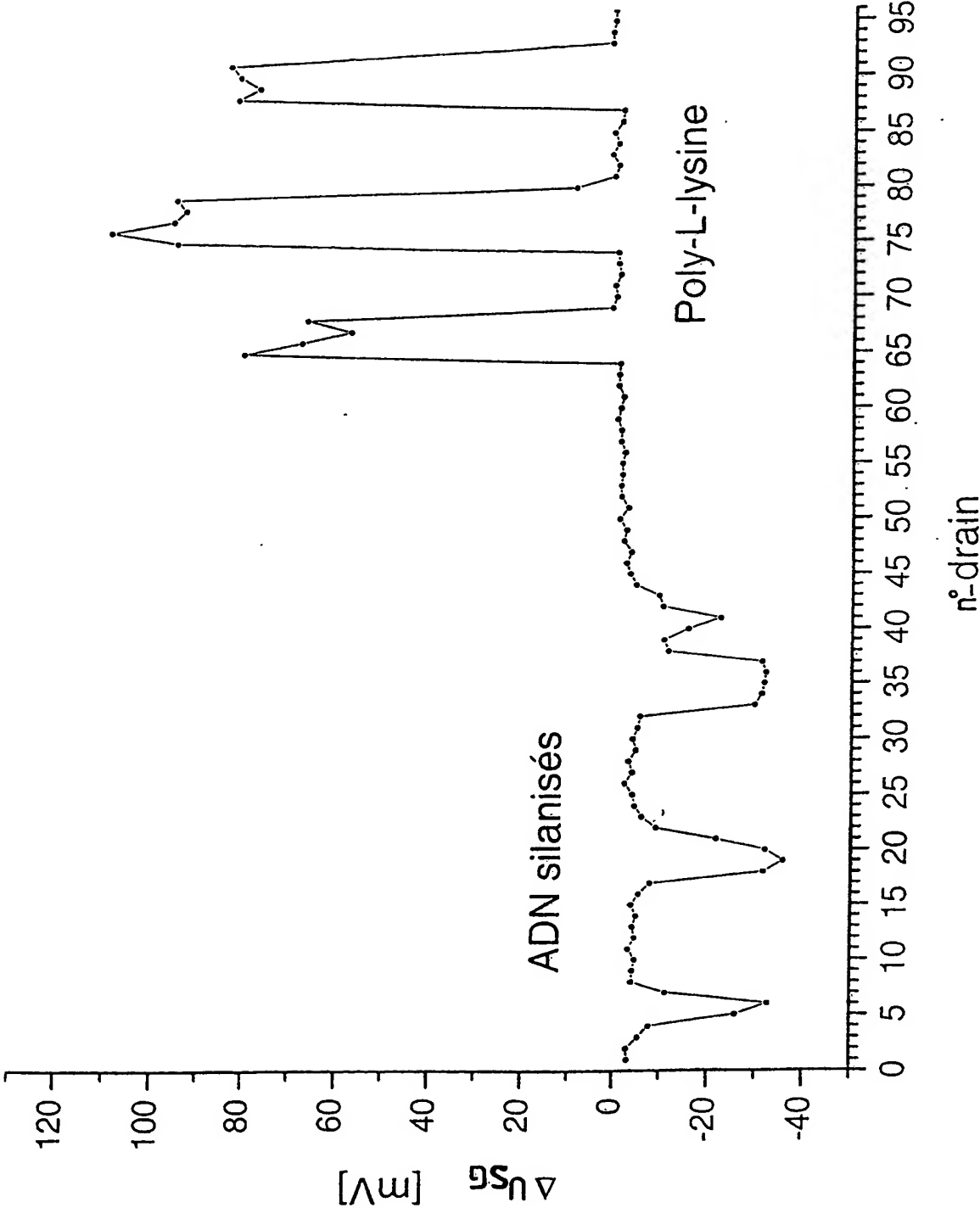
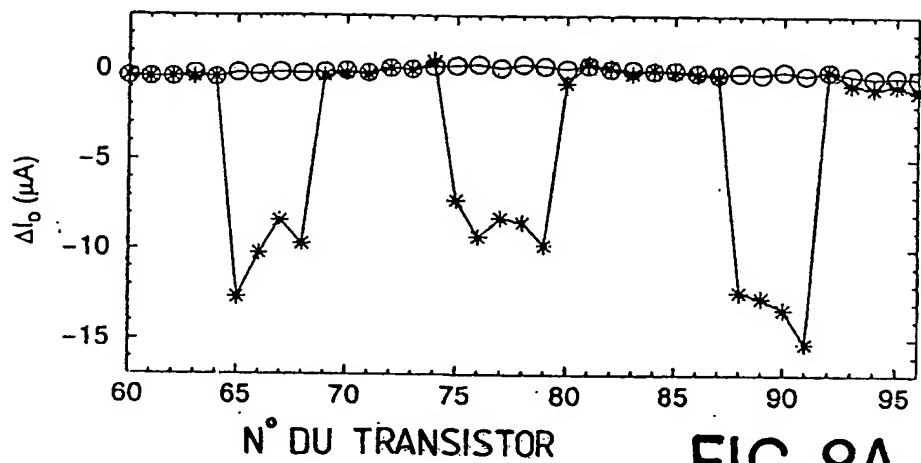
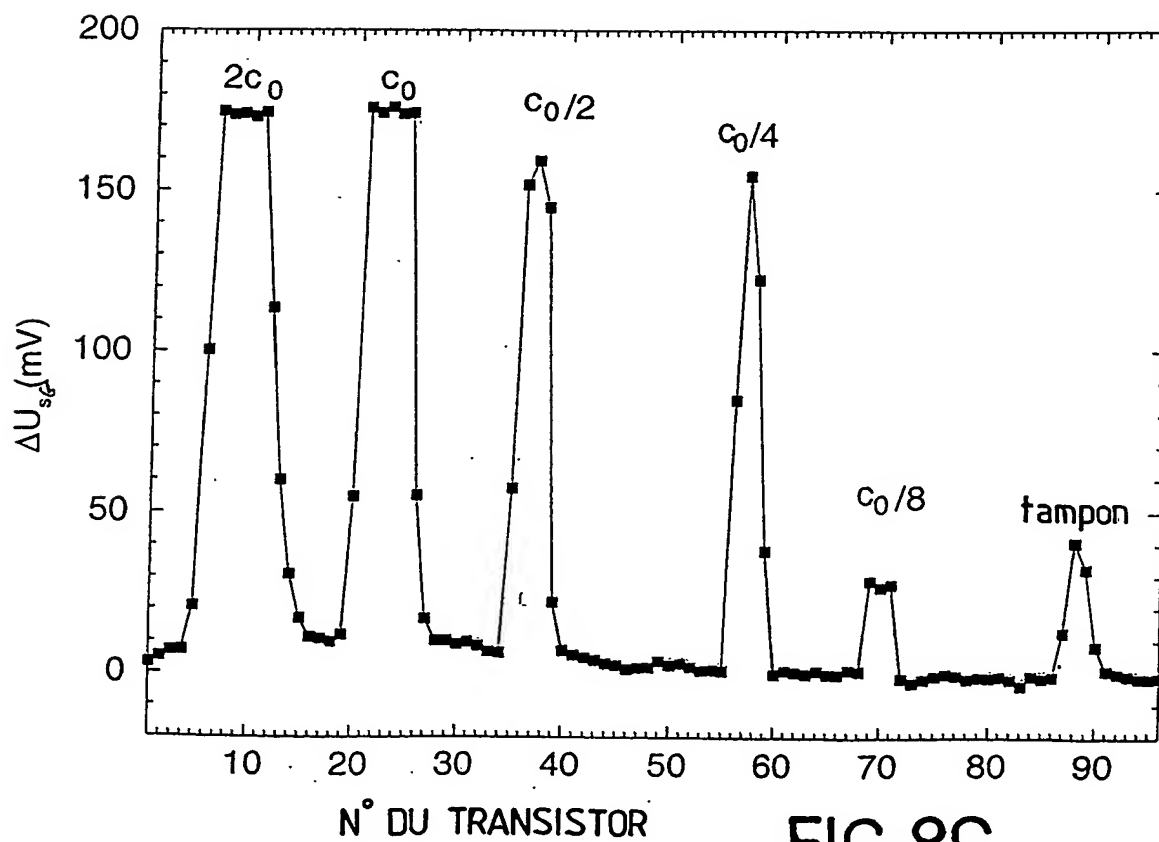
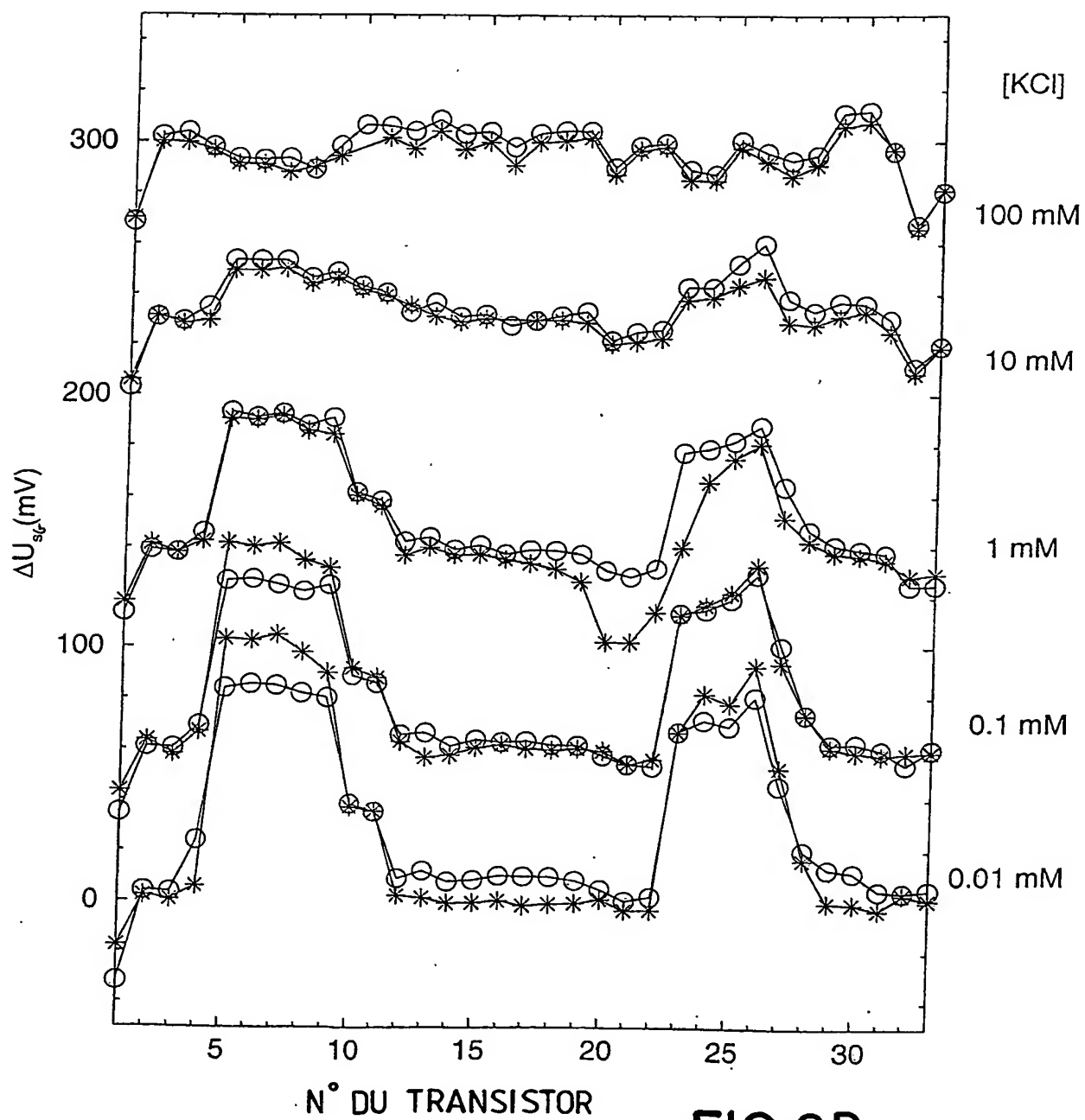


FIG.7

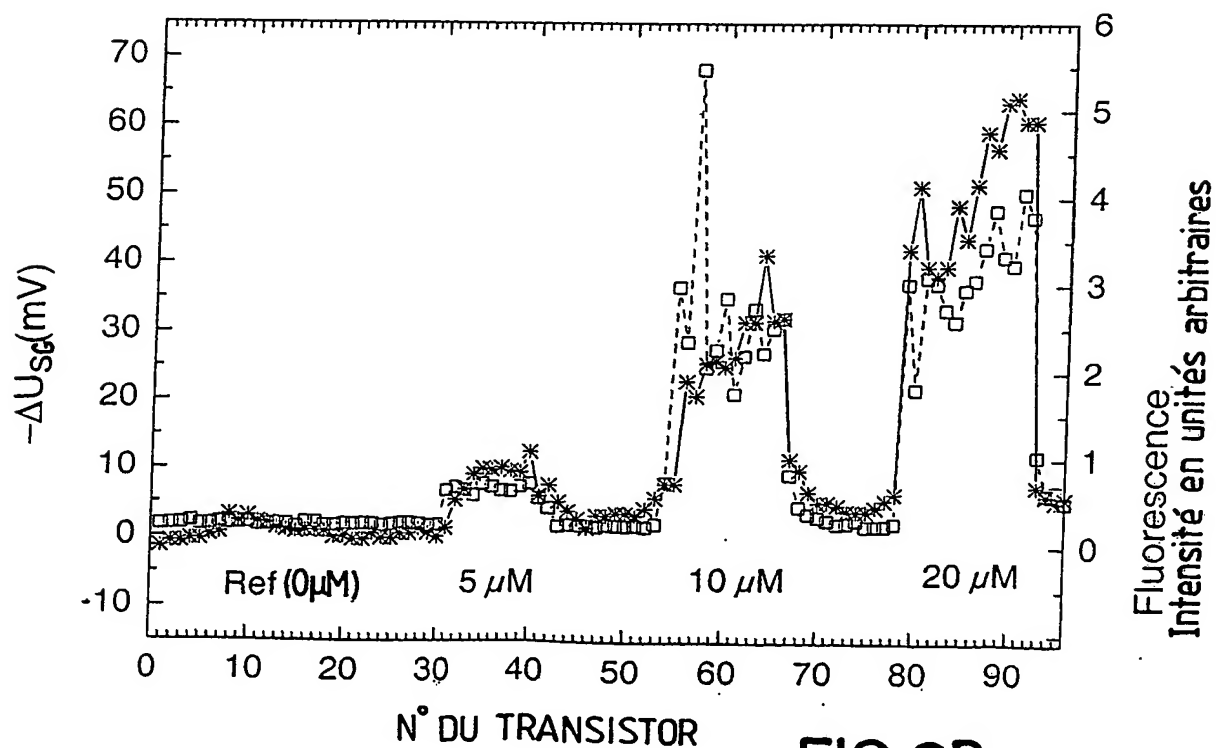
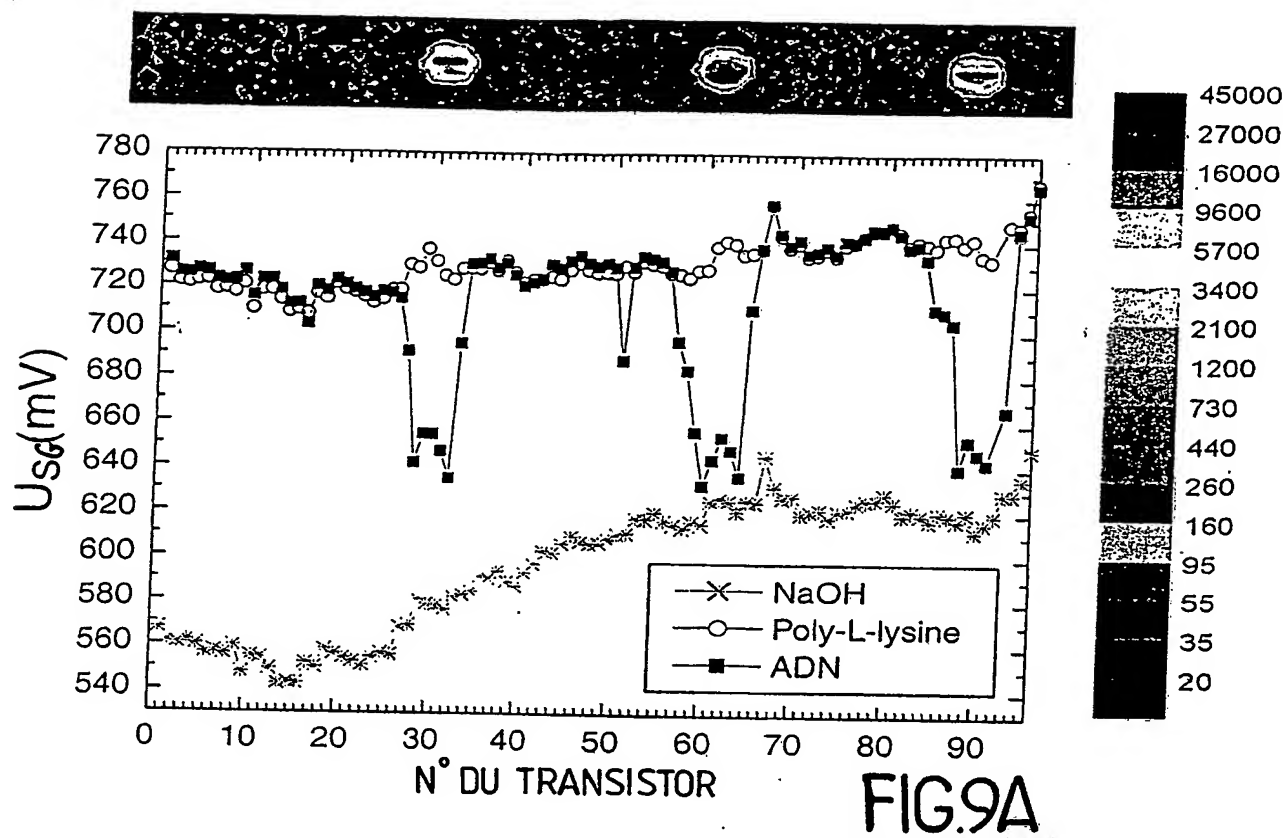
8 / 12

FIG. 8AFIG. 8C

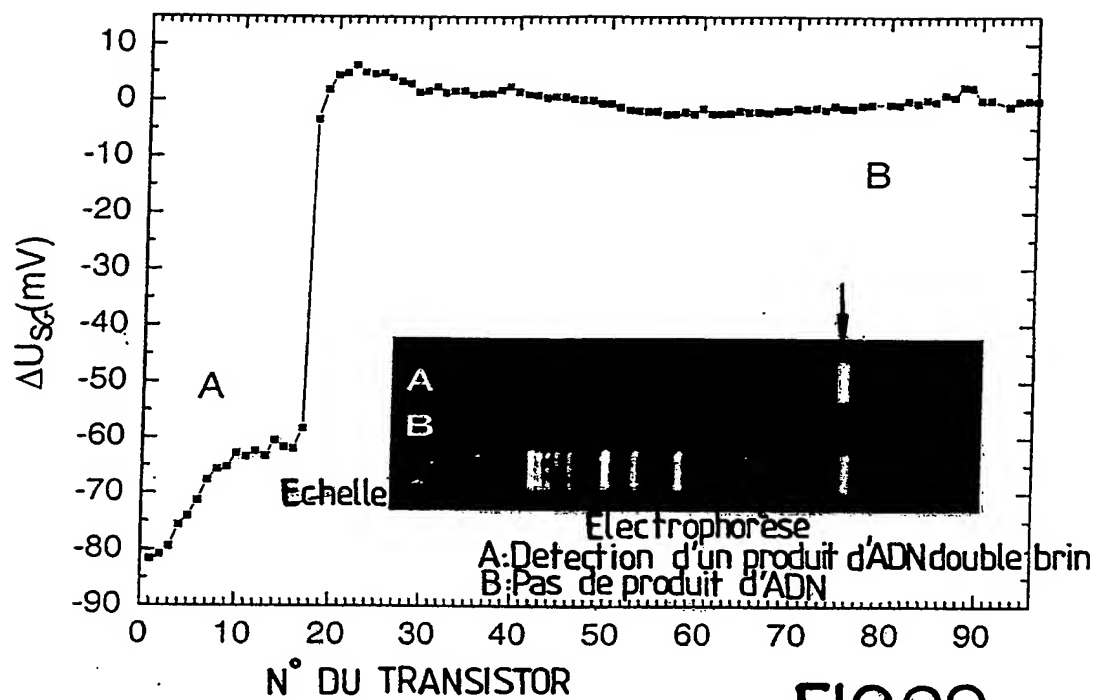
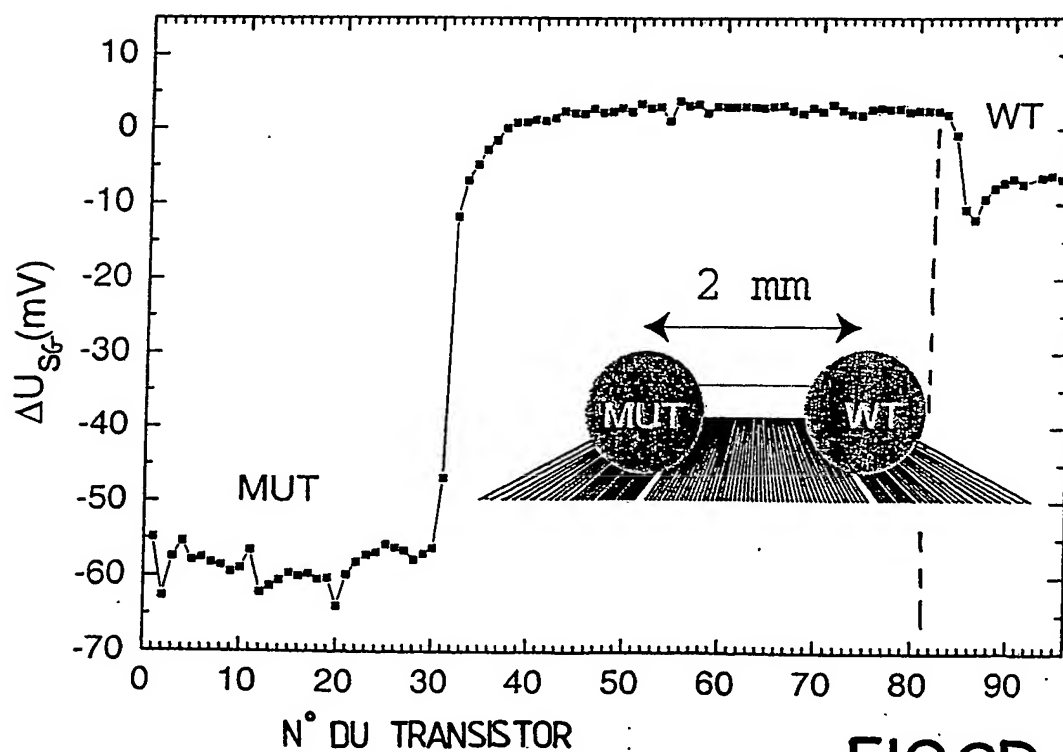
9/12

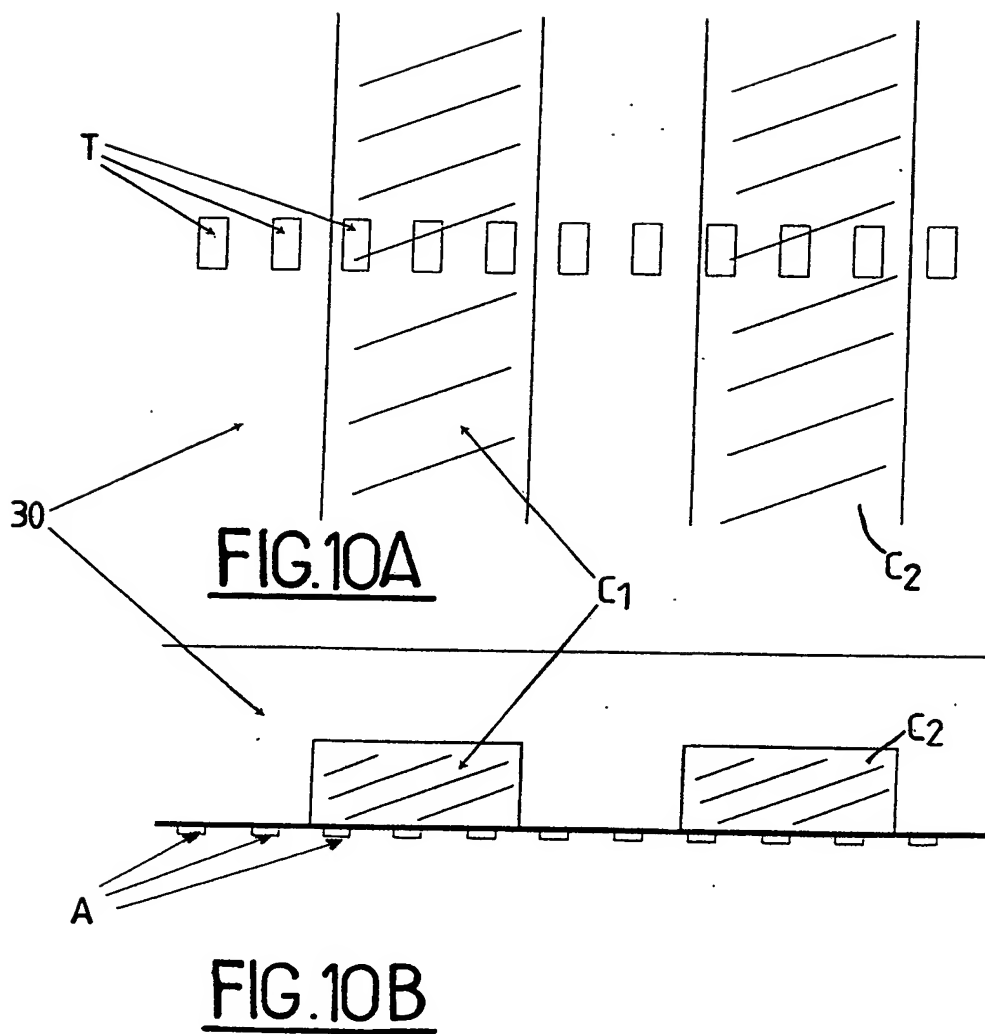
**FIG.8B**

10/12



11/12

FIG.9CFIG.9D



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/04283

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N27/327 C12Q1/00 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6 331 274 B1 (ACKLEY DONALD E ET AL) 18 December 2001 (2001-12-18) the whole document	1
A	US 6 322 963 B1 (BAUER ALAN JOSEPH) 27 November 2001 (2001-11-27) the whole document	1



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 April 2003

Date of mailing of the international search report

04/06/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 02/04283

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6331274	B1	18-12-2001	US 6099803 A	08-08-2000
			US 6287517 B1	11-09-2001
			US 5849486 A	15-12-1998
			US 5632957 A	27-05-1997
			US 6017696 A	25-01-2000
			US 5605662 A	25-02-1997
			AU 742960 B2	17-01-2002
			AU 2763899 A	06-09-1999
			BR 9909207 A	06-11-2001
			CA 2320798 A1	26-08-1999
			CN 1296525 T	23-05-2001
			EP 1054949 A1	29-11-2000
			WO 9942558 A1	26-08-1999
			US 2001026778 A1	04-10-2001
			US 2001026935 A1	04-10-2001
			US 6068818 A	30-05-2000
			US 6225059 B1	01-05-2001
			US 6254827 B1	03-07-2001
			US 6315953 B1	13-11-2001
			US 6540961 B1	01-04-2003
			US 2002028503 A1	07-03-2002
			AU 733523 B2	17-05-2001
			AU 5367198 A	29-06-1998
			BR 9713991 A	08-02-2000
			CN 1268905 A	04-10-2000
			EP 0961652 A1	08-12-1999
			JP 2002501611 T	15-01-2002
			KR 2000057400 A	15-09-2000
			WO 9824544 A1	11-06-1998
			US 6309602 B1	30-10-2001
			US 6375899 B1	23-04-2002
			US 6319472 B1	20-11-2001
			US 6423271 B1	23-07-2002
			AU 723134 B2	17-08-2000
			AU 6968996 A	17-04-1997
			BR 9610618 A	06-04-1999
			CA 2233238 A1	03-04-1997
			CN 1202929 A	23-12-1998
			EP 0852617 A1	15-07-1998
			JP 11512605 T	02-11-1999
			NZ 318253 A	28-02-2000
			US 2002085954 A1	04-07-2002
			WO 9712030 A1	03-04-1997
			US 6245508 B1	12-06-2001
			US 2002155586 A1	24-10-2002
			US 2001014449 A1	16-08-2001
			US 6187642 B1	13-02-2001
			US 6306348 B1	23-10-2001
			US 6518022 B1	11-02-2003
			US 6403367 B1	11-06-2002
US 6322963	B1	27-11-2001	AU 4162899 A	05-01-2000
			EP 1093583 A1	25-04-2001
			US 6096497 A	01-08-2000
			WO 9966322 A1	23-12-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De Internationale No
PCT/FR 02/04283

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N27/327 C12Q1/00 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 G01N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 6 331 274 B1 (ACKLEY DONALD E ET AL) 18 décembre 2001 (2001-12-18) le document en entier	1
A	US 6 322 963 B1 (BAUER ALAN JOSEPH) 27 novembre 2001 (2001-11-27) le document en entier	1

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 avril 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/06/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreno, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 02/04283

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6331274	B1	18-12-2001	US 6099803 A 08-08-2000
			US 6287517 B1 11-09-2001
			US 5849486 A 15-12-1998
			US 5632957 A 27-05-1997
			US 6017696 A 25-01-2000
			US 5605662 A 25-02-1997
			AU 742960 B2 17-01-2002
			AU 2763899 A 06-09-1999
			BR 9909207 A 06-11-2001
			CA 2320798 A1 26-08-1999
			CN 1296525 T 23-05-2001
			EP 1054949 A1 29-11-2000
			WO 9942558 A1 26-08-1999
			US 2001026778 A1 04-10-2001
			US 2001026935 A1 04-10-2001
			US 6068818 A 30-05-2000
			US 6225059 B1 01-05-2001
			US 6254827 B1 03-07-2001
			US 6315953 B1 13-11-2001
			US 6540961 B1 01-04-2003
			US 2002028503 A1 07-03-2002
			AU 733523 B2 17-05-2001
			AU 5367198 A 29-06-1998
			BR 9713991 A 08-02-2000
			CN 1268905 A 04-10-2000
			EP 0961652 A1 08-12-1999
			JP 2002501611 T 15-01-2002
			KR 2000057400 A 15-09-2000
			WO 9824544 A1 11-06-1998
			US 6309602 B1 30-10-2001
			US 6375899 B1 23-04-2002
			US 6319472 B1 20-11-2001
			US 6423271 B1 23-07-2002
			AU 723134 B2 17-08-2000
			AU 6968996 A 17-04-1997
			BR 9610618 A 06-04-1999
			CA 2233238 A1 03-04-1997
			CN 1202929 A 23-12-1998
			EP 0852617 A1 15-07-1998
			JP 11512605 T 02-11-1999
			NZ 318253 A 28-02-2000
			US 2002085954 A1 04-07-2002
			WO 9712030 A1 03-04-1997
			US 6245508 B1 12-06-2001
			US 2002155586 A1 24-10-2002
			US 2001014449 A1 16-08-2001
			US 6187642 B1 13-02-2001
			US 6306348 B1 23-10-2001
			US 6518022 B1 11-02-2003
			US 6403367 B1 11-06-2002
US 6322963	B1	27-11-2001	AU 4162899 A 05-01-2000
			EP 1093583 A1 25-04-2001
			US 6096497 A 01-08-2000
			WO 9966322 A1 23-12-1999

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.